

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q79205

Shiao-Wen TSAI, et al.

Appln. No.: 10/743,835

Group Art Unit: 1623

Confirmation No.: 1134

Examiner: Patrick T. Lewis

Filed: December 24, 2003

For: METHOD FOR PRODUCING DOUBLE-CROSSLINKED HYALURONATE
MATERIAL

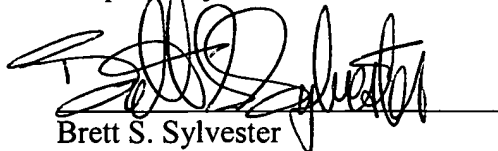
SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,



Brett S. Sylvester
Registration No. 32,765

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: Republic of China 091138117

Date: December 30, 2005

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereund

申 請 日：西元 2002 年 12 月 31 日
Application Date

申 請 案 號：091138117
Application No.

申 請 人：財團法人工業技術研究院
Applicant(s)

局 長
Director General

蔡 練 生

發文日期：西元 2003 年 3 月
Issue Date

發文字號：09220230770
Serial No.

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

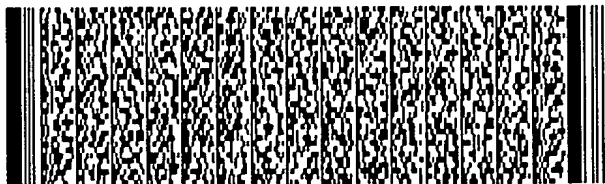
CERTIFIED
PRIORITY

| | |
|----------------|-------|
| 申請日期： 91.12.31 | IPC分類 |
| 申請案號： 91138117 | |

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

| | | |
|--------------------|-----------------------|--|
| 一、 發明名稱 | 中 文 | 雙重交鏈透明質酸材料製法 |
| | 英 文 | Method for producing a double-crosslinked hyaluronate material |
| 二、 發明人 (共6人) | 姓 名 (中文) | 1. 蔡曉雯 2. 楊炯琳 3. 陳瑞祥 |
| | 姓 名 (英文) | 1. Tsai, Shiao-Wen 2. Chiung-Lin YANG 3. Jui-Hsiang CHEN |
| | 國 籍 (中英文) | 1. 中華民國 ROC 2. 中華民國 ROC 3. 中華民國 ROC |
| | 住居所 (中 文) | 1. 新竹縣竹東鎮中興路四段195號 2. 新竹縣竹東鎮中興路四段195號 3. 新竹縣竹東鎮中興路四段195號 |
| | 住居所 (英 文) | 1. 2. 3. |
| 三、 申請人 (共1人) | 名稱或 姓 名 (中文) | 1. 財團法人工業技術研究院 |
| | 名稱或 姓 名 (英文) | 1. INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE |
| | 國 籍 (中英文) | 1. 中華民國 ROC |
| | 住居所 (營業所) (中 文) | 1. 新竹縣竹東鎮中興路四段一九五號 (本地址與前向貴局申請者相同) |
| | 住居所 (營業所) (英 文) | 1. |
| | 代表人 (中文) | 1. 翁政義 |
| 代表人 (英文) | 1. Weng, Cheng-I | |



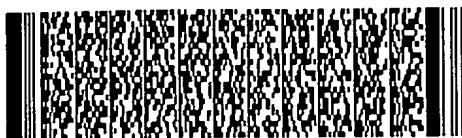
0648-8611 TVF(NU)-13910008-patricia.pfd

| | |
|-------|-------|
| 申請日期： | IPC分類 |
| 申請案號： | |

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

| | | |
|--------------------|----------------------|--|
| 一、 發明名稱 | 中文 | |
| | 英文 | |
| 二、 發明人 (共6人) | 姓名 (中文) | 4. 張珮菁 5. 蘇莉婷 6. 詹淑華 |
| | 姓名 (英文) | 4. Chang Pei-Ching 5. Li-Ting SU 6. Shu-Hua Chan |
| | 國籍 (中英文) | 4. 中華民國 ROC 5. 中華民國 ROC 6. 中華民國 ROC |
| | 住居所 (中文) | 4. 新竹縣竹東鎮中興路四段195號 5. 新竹縣竹東鎮中興路四段195號 6. 新竹縣竹東鎮中興路四段195號 |
| | 住居所 (英文) | 4. 5. 6. |
| 三、 申請人 (共1人) | 名稱或 姓名 (中文) | |
| | 名稱或 姓名 (英文) | |
| | 國籍 (中英文) | |
| | 住居所 (營業所) (中文) | |
| | 住居所 (營業所) (英文) | |
| | 代表人 (中文) | |
| | 代表人 (英文) | |



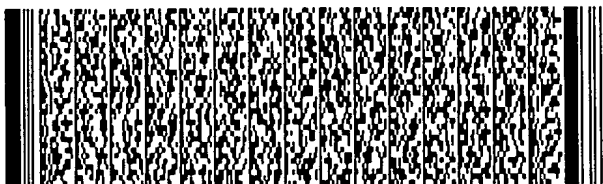
四、中文發明摘要 (發明名稱：雙重交鏈透明質酸材料製法)

本發明有關一種製造雙重交鏈透明質酸材料之方法。使透明質酸或其鹽與環氧類化合物交鏈劑及碳二亞胺類交鏈劑二者先後進行交鏈反應，而獲得更能抗生物降解之材料。

伍、本案代表圖為：第__1__圖

陸、英文發明摘要 (發明名稱：Method for producing a double-crosslinked hyaluronate material)

A method for producing a double-crosslinked hyaluronate material. A solution of a hyaluronic acid or the salt thereof is sequentially reacted with an epoxide compound and a carbodiimide compound to produce the double-crosslinked hyaluronate material which is a more biodegradation-resistant material.



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先

無

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☐有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

無

☐熟習該項技術者易於獲得,不須寄存。



五、發明說明 (1)

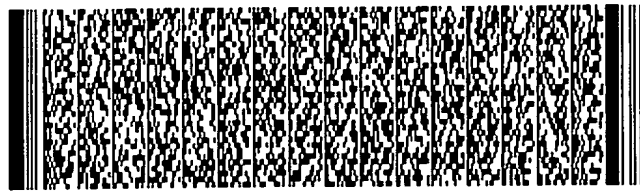
發明所屬之技術領域

本發明有關一種製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，更詳言之，本發明之方法可將原先具水溶性性質之透明質酸依序經雙重交鏈而製成雙重交鏈透明質酸材料。

先前技術

透明質酸(Hyaluronic acid, HA)係存在於脊椎動物組織與液體中之一種黏多醣。HA含有糖醛酸(uronic acid)及胺基糖(amino sugar)。為一線性高分子，分子量可由數萬至數百萬，其重複單位(repeating unit)是由D-葡糖醛酸(D-glucuronic acid)及D-N-乙醯基-葡糖胺(D-N-acetyl-glucosamine)以 β -(1-3)鍵結構成之二聚物(dimer)，再以 β -(1-4)鍵結成直鏈聚合物。在自然界中廣泛地存在於脊椎動物之結締組織、黏液組織、及眼球晶狀體，以及某些細菌莢膜中。

HA因具有以下優點：可自然存在於人體內、不會引起免疫反應、可被人體分解吸收、及已可大量取得，而成為常用於醫藥方面的生物高分子。HA主要用於白內障、角膜損傷等眼外科手術，例如將高分子量(數百萬)的HA溶液注射入眼中當黏彈液，保持眼睛的正常形狀與功能。另外HA亦可用於關節炎治療劑或關節手術。近來HA也被發展應用在一般創傷癒合(wound healing)、手術後組織抗沾黏(anti-adhesion)、及藥劑釋放(drug release)上。由於HA有保持水分的功能，可以應用於防止皮膚老化的化妝



五、發明說明 (2)

品。

因此，已有許多關於HA之研究。K. Tomihata 等人 (Biomaterials, 1997, vol 18, 189-195) 使用透明質酸水溶液，並使用二環氧化合物(diepoxy compound)中之聚(乙二醇)二縮水甘油醚(poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)做為HA之交鏈劑(cross-linker)，研究在不同之pH值條件下對HA之交鏈效果，結果，認為二環氧化合物對HA分子產生之交鏈反應在HA溶液pH值控制於pH = 6.1時是最適合的。

Malson在美國專利US 4,963,666揭示一種製造含有羧基(COOH)官能基多醣類材料之方法，將含有-COOH基之多醣類材料(例如：透明質酸)先與雙(bi-)或多官能基(poly-functional)環氧化合物於鹼性條件反應，形成所謂的環氧活化(epoxy-activation)之多醣類材料，於此反應階段不會有膠狀物(gel)形成，且多醣類材料仍為可溶性，接著將反應後剩餘之環氧化合物移除(例如，利用透析法)，接著再將此多醣類溶液倒入一模具內靜置乾燥，在乾燥過程中，此環氧活化之多醣類材料進行交鏈反應。

Sakurai在美國專利US 4,716,224揭示一種交鏈性透明質酸之製法，此專利中交鏈劑為多官能基性環氧化合物(poly-functional epoxy compound)，包括鹵甲基環氧化合物(halomethyloxirane)，及雙環氧化合物(bis-epoxy compound)型交鏈劑，交鏈劑與透明質酸交鏈反應後之交鏈指數(crosslinking index)為100個雙醣單



五、發明說明 (3)

位分子形成 5~20 個交鏈反應，且交鏈後之透明質酸材料為水可溶性及粘稠狀(stringy)。

Burns 等人在美國專利US 5,017,229 中，揭示一種透明質酸非水溶性衍生物之製法，宣稱使用固形份(Solid content) 0.4 %~2.6% 之透明質酸溶液，pH 值為4.75，配合活化劑例如EDC (1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基碳二亞胺鹽酸鹽；1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride)可製出透明質酸水不可溶性水凝膠(hydrogel)。

Burns 等人在US5,527,893 專利中揭示一種聚陰離子多醣水不可溶性衍生物之製法。特點在於HA以EDC交鏈程序中，再加入另一種丙烯基尿素(acryl urea)衍生物，以得到一種改質之透明質酸水膠。

Kuo 等人在US 5,356,883 專利中揭示一種水不可溶性明質酸凝膠、薄膜、及海綿之製法。其係使用EDC交鏈劑，加入HA溶液中，經反應後，再加入乙醇以將產物沈澱析出，即為非水溶性膠體。

Kuo 等人在US 5,502,081 專利中揭示將具藥物活性之物質，經由碳二亞胺(carbodiimide)類化合物之作用，以共價鍵結合於透明質酸高分子鏈上。

Kuo 在US 6,013,679 專利中揭示非水溶性透明質酸衍生物之製備方法。其係利用碳二亞胺類化合物做為透明質酸之化學交鏈劑，形成非水溶性透明質酸衍生物。

De Belder 等人在WO 86/00912 專利中揭示一種防止身



五、發明說明 (4)

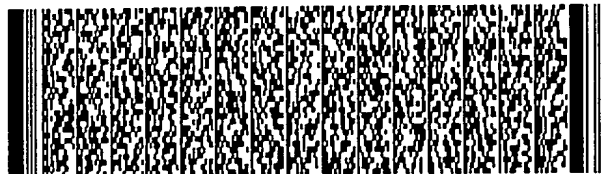
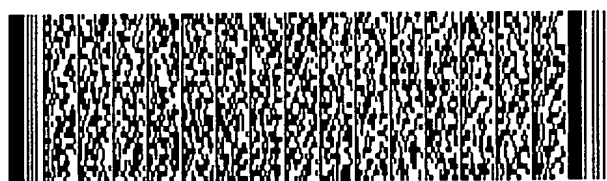
體組織沾黏之膠體(Gel)之製備方法。此種膠體係由含羧基之多醣類材料(例如透明質酸)，使用多官能基性環氧化合物交鏈透明質酸以形成交鏈性之透明質酸膠體。

Malson 等人在WO 86/00079專利中揭示一種交鏈性透明質酸膠體之製法。使用多官能基性環氧化合物，或鹵代醇、表鹵醇、或鹵化物做為透明質酸之交鏈劑反應，得到一種滅菌、不具熱原反應(pyrogen-free)之透明質酸膠體。

Malson 等人在WO 90/09401及US 5,783,691專利中揭示一種交鏈性透明質酸膠體之製法，特徵係使用含磷化合物做為透明質酸之交鏈劑。

Malson 等人在US 4,716,154專利中揭示一種交鏈性透明質酸膠體之製法，此HA膠體適合做眼科視網膜手術中玻璃體替代物。其特徵為使用多官能基環氧化合物、鹵代醇、表鹵醇、或鹵化物做為透明質酸之交鏈劑，以製備交鏈性透明質酸膠體。於此專利實施例中，Malson等人使用高固形份之HA溶液，在鹼性HA溶液中加入環氧化合物(例如：BDDE)，經由實驗結果發現HA溶液必須在HA固形份超過13.3%以上時，反應溫度超過50℃時方可形成HA膠體。

Nobuhiko 等人(Journal of controlled Release, 25, 1993, p133-143)揭示一種含有磷脂質微粒之交鏈性透明質酸之製備方法，係將透明質酸形成HA固形份約為20 wt%之鹼性溶液，再加入適量之PGPGE (聚甘油聚縮縮水甘油醚(Polyglycerol polyglycidyl ether))環氧化合物，



五、發明說明 (5)

其中PGPGE與HA之重複單元化學計量莫耳比約為1.0。此反應混合物於60℃反應15分鐘後可形成交鏈性HA膠體。

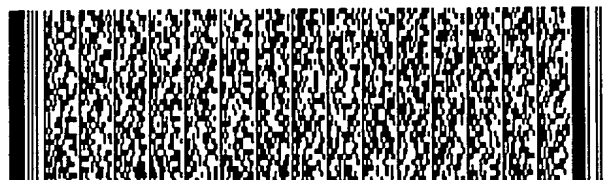
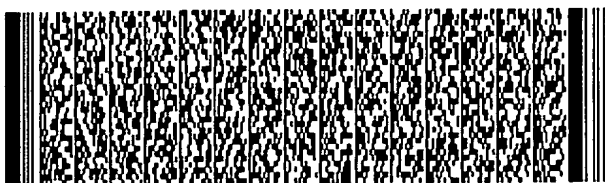
Nobuhiko等人(Journal of controlled Release, 22, 1992, p105-106)揭示一種製備交鏈性透明質酸膠體之製法，將透明質酸形成固形份約為20 wt%之鹼性HA溶液，再加入已溶於乙醇之EGDGE (乙二醇二縮水甘油醚(Ethylene glycol diglycidyl ether))或PGPGE環氧化合物，於60℃溫度下反應15分鐘，可得到交鏈性HA膠體。

Balazs等人在US 4,582,865(1986)及US 4,605,691(1986)專利中揭示一種交鏈性透明質酸膠體之製法，使用HA溶液，在pH值超過9.0之條件下，使用二乙烯基磺(divinyl sulfone)做為HA之化學交鏈劑，以製得交鏈性透明質酸膠體。

Hamilton等人在US 4,937,270 專利中揭示一種使用EDC及氯化L-白胺酸甲酯(L-leucine methyl ester chloride)對透明質酸進行化學交鏈，以製備非水溶性HA水膠之製法。

Miller等人在US 5,760,200 專利中揭示一種非水溶性多醣類衍生物之製法，使用多醣類材料(例如：透明質酸)水溶液，於酸性pH值條件下，加入EDC及氯化L-白胺酸甲酯對HA進行化學交鏈，以形成非水溶性HA膠體。

中華民國專利申請案第90110451號(申請中，係相同申請人)揭示一種環氧化合物交鏈多醣類材料之製造方法，是使透明質酸多醣類先成型後再以環氧化合物進行交



五、發明說明 (6)

聯反應。

中華民國專利申請案第89127293號(申請中，係相同申請人)揭示一種非水溶性交鏈性多醣類材料之製法，是使透明質酸多醣類先與環氧化物進行交聯之後再成型。

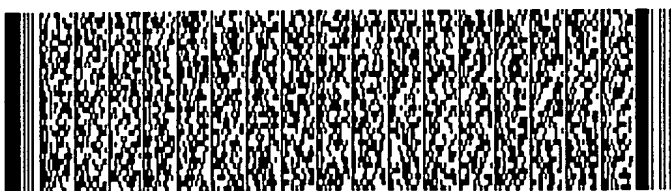
中華民國專利申請案第90119567號(申請中，係相同申請人)揭示一種交鏈型透明質酸-蛋白質生物複合材料及其製法。

綜上所述，目前有將透明質酸材料經環氧化物或碳二亞胺其中之一者交鏈而得交鏈透明質酸材料之技術，但是所得之交鏈透明質酸之生物降解或水解劣化抵抗性僅能達到某種特定效果。

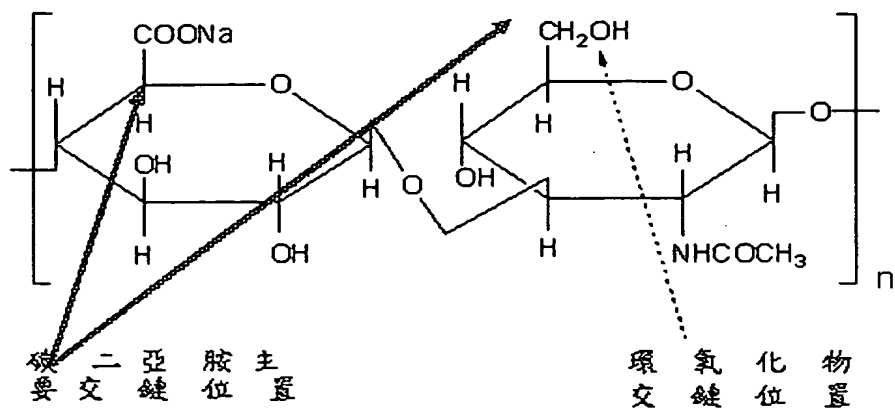
發明內容

本發明之目的係提供一種製造雙重交鏈透明質酸材料之方法。

本發明之新穎方法與彼等目前之技術差異性極大，係將透明質酸類材料分子結構中之羧基及羥基分別分段使用碳二亞胺(針對羧基與羥基)及環氧化物(針對羥基)予以雙重交鏈，如下所示：



五、發明說明 (7)



以獲得雙重交鏈透明質酸材料，方法新穎而未曾見述於先前技藝中。所獲得之雙重交鏈透明質酸具有優異之生物降解或水解劣化抵抗性及甚至於機械強度(手術操作韌性手感)，遠超過單獨使用環氧化物或碳二亞胺交鏈所得之透明質酸材料數倍以上，可更有利的應用於生物體。本發明之方法更可用於交鏈透明質酸材料之量產，商業利用潛力極高。

實施方式

本發明之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，包括下列步驟：(a)將透明質酸或其鹽形成溶液，(b)使該透明質酸或其鹽之溶液與擇自環氧類化合物交鏈劑與碳二亞胺類交鏈劑二者中之一者進行第一次交鏈反應，及(c)將步驟(b)所得之產物與擇自環氧類化合物交鏈劑與碳二亞胺類



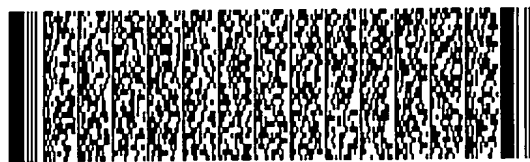
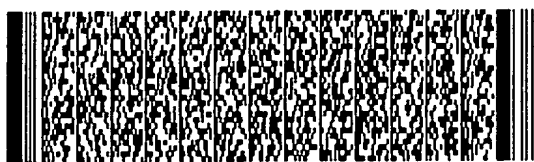
五、發明說明 (8)

交鏈劑二者中且未在步驟(b)中使用之一者進行第二次交鏈反應，而獲得雙重交鏈透明質酸材料。

更詳言之，本發明之方法在進行分段、雙重交鏈時，可先使用環氧類化合物交鏈劑做為第一次交鏈反應中之交鏈劑，及然後使用碳二亞胺類交鏈劑做為第二次交鏈反應中之交鏈劑；或者，可先使用碳二亞胺類交鏈劑做為第一次交鏈反應中之交鏈劑，及然後使用環氧類化合物交鏈劑做為第二次交鏈反應中之交鏈劑。簡言之，使用碳二亞胺類與環氧類化合物交鏈劑分別進行交鏈反應之先後次序可互相調換。

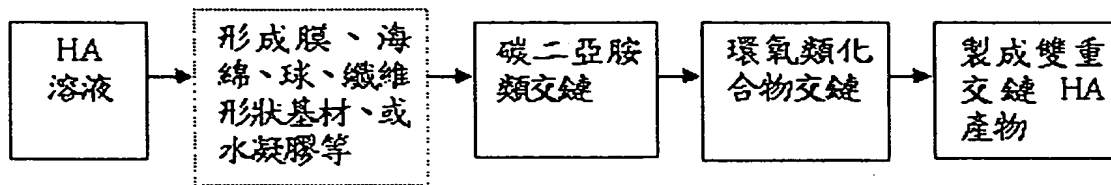
參閱第1a及1b圖，第1a圖為本發明之一實施例中透明質酸經過環氧化物交鏈反應後之膜之FTIR光譜圖。第1b圖為該實施例中將透明質酸經過環氧化物交鏈反應後之膜再經過碳二亞胺交鏈反應後，所得之分段、雙重交鏈產物之FTIR光譜圖。從二圖中可看出在第1b圖中有在 1700 cm^{-1} 處相對應於 $\text{C}=\text{O}$ 之波峰，為第1a圖中所沒有，顯示經過碳二亞胺交鏈反應後，確有雙重交鏈之結果。

下列流程圖一與二可簡要顯示本發明之方法之流程：
流程圖一：

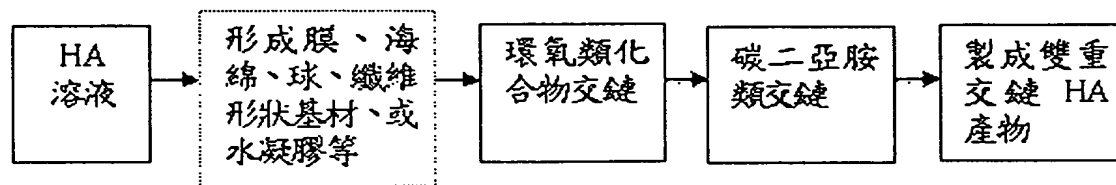


五、發明說明 (9)

方法 A

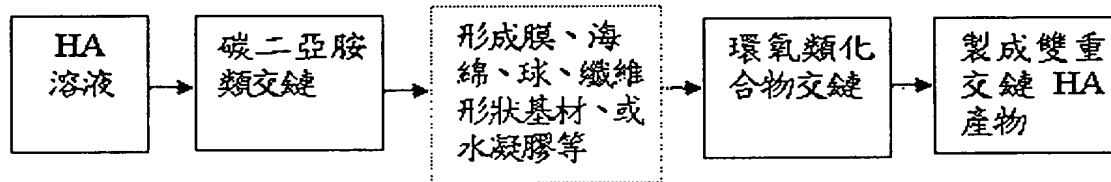


方法 B

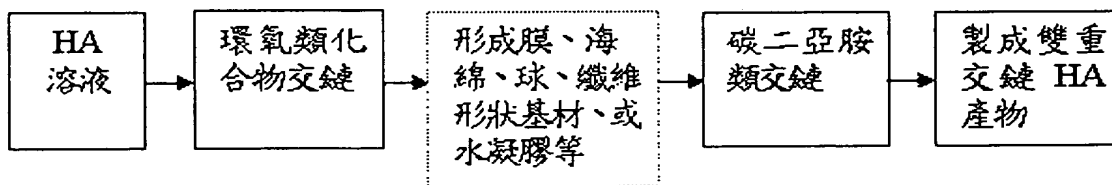


流程圖二：

方法 A



方法 B



五、發明說明 (10)

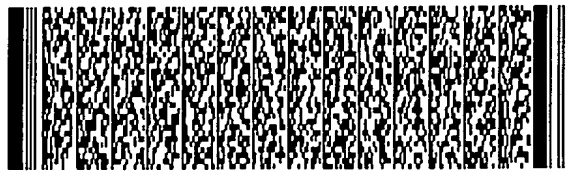
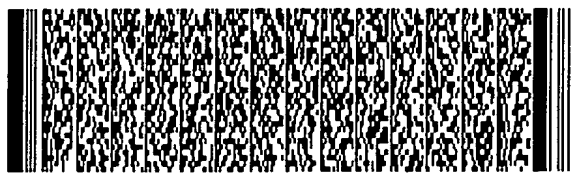
流程圖中，加上視需要而定之形成膜、海綿、球、纖維形狀基材、或水凝膠等之步驟。如流程圖一所示，本發明可進一步在第一次交鏈步驟之前先將透明質酸溶液形成薄膜、纖維、圓球、多孔性等型態之基材、或膠體等，再繼續後續之步驟。

或是，如流程圖二所示，本發明亦可在第二次交鏈步驟之前先將透明質酸溶液形成薄膜、纖維、圓球、多孔性等型態之基材、或膠體等，再繼續後續之步驟。

如本發明之步驟(a)中，將透明質酸或其鹽形成溶液。所使用之透明質酸係屬於多醣體，可為生物體內各種透明質酸或人工合成之透明質酸。其鹽可為其任何形式之鹽，例如鹼金屬、鹼土金屬鹽、銨鹽、及鹽酸鹽等等。所使用之溶劑為水。

在本發明之方法之步驟(b)中，使該透明質酸或其鹽之溶液與環氧類化合物交鏈劑或碳二亞胺類交鏈劑二者中之一者進行第一次交鏈反應。

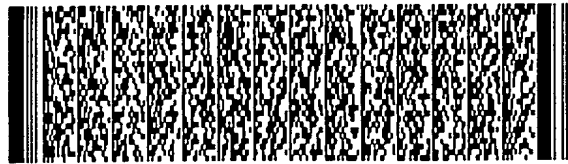
可使用於本發明之環氧類化合物包括雙官能基、三官能基、及四官能基環氧類化合物等多官能基環氧類化合物，舉例而言，多官能基環氧類化合物包括但不限于下列：1,4-丁二醇二縮水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether; BDDE)、乙二醇二縮水甘油醚(ethylene glycol diglycidyl ether; EGDGE)、1,6-己二醇二縮水甘油醚(1,6-hexanediol diglycidyl



五、發明說明 (11)

ether)、聚乙二醇二縮水甘油醚(Polyethylene glycol diglycidyl ether)、聚丙二醇二縮水甘油醚(Polypropylene glycol diglycidyl ether)、聚四亞甲基二醇二縮水甘油醚(polytetramethylene glycol diglycidyl ether)、新戊二醇二縮水甘油醚(Neopentyl glycol diglycidyl ether)、聚甘油多縮水甘油醚(polyglycerol polyglycidyl ether)、二甘油聚縮水甘油醚(diglycerol polyglycidyl ether)、甘油聚縮水甘油醚(glycerol polyglycidyl ether)、三羥甲基丙烷聚縮水甘油醚(tri-methylolpropane polyglycidyl ether)、季戊四醇聚縮水甘油醚(Pentaerythritol Polyglycidyl Ether)、及山梨糖醇聚縮水甘油醚(sorbitol polyglycidyl ether)。以上僅是列舉，可適用於本發明之環氧類化合物並不侷限於此。環氧類化合物交鏈劑中環氧化物之重量濃度為1%至30%，較佳為3至30%。透明質酸或其鹽與環氧類化合物交鏈劑進行交鏈反應之當量比可為1:50至1:1進行交鏈反應之溫度為20至60℃，而較佳為20至50℃。反應之時間為30分鐘以上，較佳為30分鐘至12小時，更佳為60分鐘至12小時。

可使用於本發明之碳二亞胺類可舉例包括但不限於：1-甲基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺、1-甲基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺、3-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺、或其混合物。碳二亞胺類交鏈劑中碳二亞胺重量濃度為0.5%至30%，較佳為3至30%。進行交鏈反應時



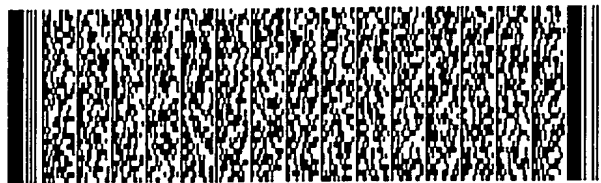
五、發明說明 (12)

之溫度為20至60℃，而較佳為20至50℃。反應之時間為30分鐘以上，較佳為30分鐘至12小時，更佳為60分鐘至12小時。

在進行步驟(b)之第一次交鏈反應之前，可先將透明質酸或其鹽之溶液以習用之方法形成薄膜、纖維、圓球、多孔性等型態之基材、或膠體。

形成薄膜之方法可舉例說明如下：將透明質酸或其鹽之溶液置入模具內，經乾燥後形成厚度介於10-500 μm 之透明質酸多醣類薄膜狀(film)材料。透明質酸或其鹽之溶液之濃度較佳在1至20%之範圍，更佳在2.5至20%之範圍。模具之材質可為陶瓷、金屬、及高分子類材料。形成透明質酸薄膜狀材料乾燥之溫度為25-70℃，而以25-45℃為佳。

形成纖維或圓球型態基材之方法可舉例說明如下：將透明質酸或其鹽之溶液利用押出裝置擠出進入含有機溶劑之凝固液(Coagulant)中，形成纖維狀之透明質酸纖維材料。亦可將透明質酸之溶液間歇式擠出滴入於凝固液(Coagulant)中，形成直徑介於2.0-0.1mm之圓球狀材料基材。含有機溶劑之凝固液係由水及有機溶劑所構成。有機溶劑可使用例如：1,4-二噁烷、氯仿、二氯甲烷、N,N-二甲基甲醯胺(DMF)、N,N-二甲基乙醯胺(DMAc)、乙酸乙酯、或丙酮、甲乙酮(MEK)等酮類溶劑、或甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、丁醇等醇類溶劑。於凝固液中有機溶劑之重量分率(weight fraction)佔60-100%，而以75-100%為



五、發明說明 (13)

佳，且酮類與醇類溶劑可以任意比例使用。

形成多孔性形態基材之方法可舉例說明如下：將透明質酸或其鹽之溶液置入於適當形狀之模具內，再使用冷凍乾燥方法，製成多孔性且孔洞型態(Pore morphology)為交互連通(interconnective)之結構。

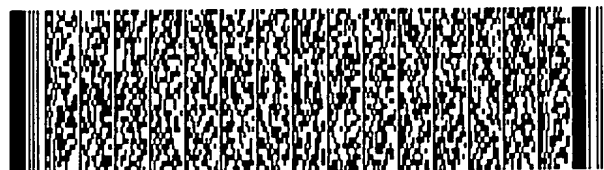
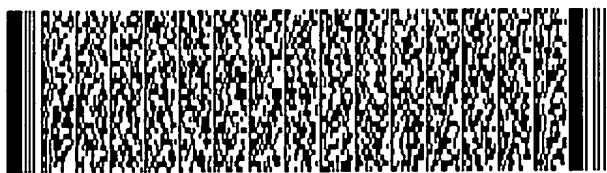
在賦予透明質酸或其鹽形狀後，將此具形狀之基材置於交鏈劑中進行第一次交鏈反應。

將第一次交鏈反應後之產物使用清洗液洗除殘留之交鏈劑後進行步驟(c)之第二次交鏈反應。清洗液可為任何可洗除殘留交鏈劑之溶液，但依產物之用途考量，以不對健康有損害之溶液較佳。

步驟(c)中所使用之交鏈劑係使用未在第一次交鏈反應時使用之環氧類化合物或碳二亞胺類交鏈劑。若在步驟(b)中已使用環氧類化合物交鏈劑進行交鏈，則在步驟(c)中使用碳二亞胺類交鏈劑做為第二次交鏈；反之，若在步驟(b)中已使用碳二亞胺類交鏈劑進行交鏈，則在步驟(c)中使用環氧類化合物交鏈劑做為第二次交鏈。在步驟(c)中可使用的種類與反應條件與上述步驟(b)中相同。

再者，若在進行步驟(b)之前未將透明質酸或其鹽之溶液製做成薄膜、纖維、圓球、多孔性等型態之基材、或膠體等，則可在進行步驟(c)之前依所需之形狀或用途如上述製成特定型態之基材或膠體，然後進行步驟(c)。

經過步驟(c)之第二次交鏈後所得之產物為分段、雙重交鏈之透明質酸材料。可使用清洗劑及水分別清洗產



五、發明說明 (14)

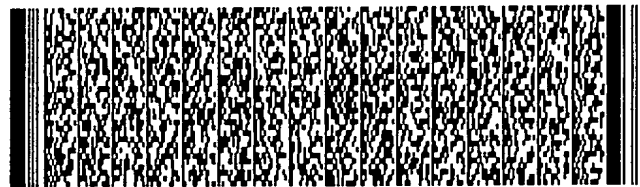
物。可使用之清洗劑為含水之混合有機溶劑，有機溶劑可為酮類(例如：丙酮、甲乙酮(MEK)等)、醇類(例如：甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、丁醇等)。於清洗液中有機溶劑之重量分率(weight fraction)佔20至100%，而酮類與醇類溶劑可以任意比例使用。清洗液之溫度為15℃至50℃，而以20℃至50℃為佳。將經過清洗液清洗後之透明質酸材料基材，使用溫度為25℃至50℃之水清洗，再使用溫度60℃以下之熱風式乾燥、輻射式加熱乾燥、或真空式乾燥方式予以烘乾。所得之分段、雙重交鏈之透明質酸材料最終產物依製造步驟中是否經製做成特定形狀而可能為粉末狀、薄膜狀、海綿狀、纖維狀、圓球狀粒子、或膠體等，酵素分解性低，適合應用於醫學或化妝品用途。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉出較佳實施例予以詳細說明。

實施例1

EDC-環氧化物分段、雙重交鏈透明質酸材料之製法

取透明質酸鈉鹽(sodium hyaluronate)粉末0.1克溶解於10 ml 蒸餾水中，於室溫條件攪拌均勻後形成1%之透明質酸溶液，再將透明質酸溶液倒入鐵氟龍(Teflon)材質製成之平板模具內，於35℃之烘箱中乾燥，形成厚度約50 μ m之透明質酸薄膜。將薄膜置於過量EDC交鏈劑(EDC之2 wt%之溶液，溶劑為丙酮/水=70/30 v/v)中，於設定之交鏈溫度及時間下，如表1所示，進行透明質酸薄膜碳二亞



五、發明說明 (15)

胺交鏈反應。將所得之透明質酸薄膜置入清洗液中(組成份為80 wt%之丙酮水溶液)清洗，再置於過量EGDGE環氧化物交鏈液(EGDGE之2 wt%之溶液，溶劑為丙酮/水=70/30 v/v)中進行第二段交鏈反應(反應條件如表1所示)。將所得之透明質酸薄膜先置入清洗液中(組成份為50 wt%之丙酮水溶液)清洗數次後，再置入蒸餾水中清洗。將經環氧化物及EDC分段、雙重交鏈之透明質酸薄膜乾燥後，於0.15 M NaCl 水溶液中進行體外透明質酸酵素降解試驗(in vitro hyaluronidase degradation)。結果如表1所示。

比較例1

以實施例1之相同配方，但不加入任何交鏈劑，不經任何交鏈反應，用實施例1相同之成膜方法形成薄膜，做體外透明質酸酵素降解試驗。

比較例2

如實施例1之相同方式進行，但僅進行一次使用EDC做為交鏈劑之交鏈反應，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表1所示。

比較例3

如實施例1之相同方式進行，但僅進行一次使用環氧化物做為交鏈劑之交鏈反應，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表1所示。



表 1

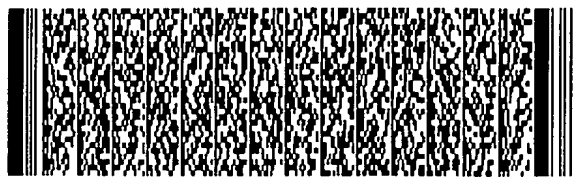
| | 實施例 1 | 比較例 1 | 比較例 2 | 比較例 3 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| 材料型態 | 膜 | 膜 | 膜 | 膜 |
| 第一段 EDC 交鏈濃度 w/v (丙酮 / 水 = 70 / 30 v/v) | 2 | --- | 4 | --- |
| EDC 交鏈溫度(°C)/時間(min) | 35/60 | --- | 35/60 | --- |
| 第二段 EGDGE 環氧化物交鏈濃度 w/v, (丙酮 / 水 = 70 / 30 v/v) | 2 | --- | --- | 4 |
| 環氧化物交鏈溫度(°C)/時間(小時) | 35/2 | --- | --- | 35/4 |
| 體外透明質酸酵素降解試驗, (220U/mL, 35°C, 過夜) | 0.08% | 43.5% | 0.97% | 0.66% |

由表1可知，本發明之方法所製得之產物具有較比較例1、2、與3優異之抗生物降解性。

實施例2

環氧化物-EDC 分段雙重交鏈透明質酸材料之製法

取透明質酸鈉鹽粉末0.1克(含有1.0毫當量(meq) 羥基)，溶於10ml之蒸餾水中，於室溫條件下攪拌均勻後形成固形份(Solid content) 1%之透明質酸溶液。將此透明質酸溶液預熱至35°C，再加入定量之乙二醇二縮水甘油醚



五、發明說明 (17)

(EGDGE)環氧化物至透明質酸溶液(如表2所示)，於設定之交鏈溫度及時間下，攪拌進行透明質酸交鏈反應。再將EGDGE環氧化物交鏈後之透明質酸溶液，倒入鐵氟龍材質製成之平板模具內，於35℃之烘箱內乾燥成膜。將乾燥後之透明質酸薄膜置入清洗液中(組成份為80 wt%之丙酮水溶液)清洗，再置入蒸餾水中清洗。於35℃之烘箱內乾燥後得到一透明質酸薄膜。將此透明質酸薄膜置入EDC交鏈液(5 wt%之EDC溶液，溶劑為丙酮/水=80/20 v/v)中(如表2所示)，於35℃恆溫反應3小時。然後，將所得之分段、雙重交鏈透明質酸薄膜置入清洗液(丙酮/水：70/30)中清洗。再於35℃之烘箱中乾燥後，進行體外透明質酸酵素降解測試，結果如表2所示。

實施例3

如實施例2之相同方式進行，但使用10 wt%之EDC交鏈劑濃度，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表2所示。第一次經環氧化物交鏈反應後之產物及再經第二次碳二亞胺交鏈反應後之產物之FTIR分析圖譜示於第1a圖及第1b圖。

實施例4

如實施例2之相同方式進行，但使用20 wt%之EDC交鏈劑濃度，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表2所示。

比較例4

以實施例2之相同配方，但不加入任何交鏈劑，不經



五、發明說明 (18)

任何交鏈反應，用實施例2相同之成膜方法形成薄膜，做體外透明質酸酵素降解試驗。

比較例5

如實施例2之相同方式進行，但僅進行一次使用EGDGE環氧化物做為交鏈劑之交鏈反應，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表2所示。



五、發明說明 (19)

表 2

| | 實施例 2 | 實施例 3 | 實施例 4 | 比較例 4 | 比較例 5 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| 材料型態 | 膜 | 膜 | 膜 | 膜 | 膜 |
| 第一段 EGDGE 環氧化物 交鏈濃度 wt% (丙酮/水=80/20 v/v) | 10 | 10 | 10 | --- | 10 |
| 環氧化物交鏈溫度 (°C)/時間(hr) | 35/4 | 35/4 | 35/4 | --- | 35/4 |
| 第二段 EDC 交鏈濃度 wt% (丙酮/水=80/20 v/v) | 5 | 10 | 20 | --- | --- |
| EDC 交鏈溫度(°C)/時 間(小時) | 35/3 | 35/3 | 35/3 | --- | --- |
| 體外透明質酸酵素降 解試驗，(220 U / mL, 35°C，過夜) | 0.35% | 0.12% | 0.15% | 32.8% | 2% |

由表2可知，依據本發明之方法之實施例2、3、及4所製得之雙重交鏈性透明質酸薄膜材料具有較比較例4與5優異之抗生物降解性。



實施例5

環氧化物- EDC 分段雙重交鏈透明質酸水凝膠之製法

配製分子量22萬、pH 10、固形份20%的透明質酸水溶液，再緩緩加入EX-861(商品名，Nagase公司販售，為聚乙二醇二縮水甘油醚)(透明質酸與EX-861之交鏈當量比為1:4)，攪拌均勻，於室溫下反應4小時後，形成透明質酸水凝膠。以50%酒精清洗浸泡數天，經過擠碎、冷凍乾燥，形成粉末狀。再將此透明質酸粉末(HA/EX-861)浸泡於pH 4.7的水中，以EDC(透明質酸與EDC之交鏈當量比為1:4)於室溫下反應4小時進行第二次交鏈。反應後置入透析膜中，對水透析一晚，透析完後之水凝膠再經過冷凍乾燥後，進行酵素分解測試。

比較例6

以實施例5之相同配方，但不加入任何交鏈劑，不經任何交鏈反應，用實施例1相同之成膜方法形成薄膜，做體外透明質酸酵素降解試驗。

比較例7

如實施例5之相同方式進行透明質酸水凝膠之製造，但僅進行一段交鏈反應，係使用EX-861環氧化物(HA:環氧化物當量比=1:8)做為交鏈劑，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表3所示。



表 3

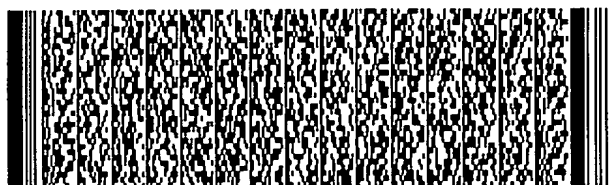
| | 實施例 5 | 比較例 6 | 比較例 7 |
|--------------------------------------|--------|-------|--------|
| 第一段 EX-861 交鏈當量比, (HA:Ex-861) | 1 : 4 | --- | 1:8 |
| 環氧化物交鏈溫度(°C)/時間(hr) | 25/4 | --- | 25/4 |
| 第二段 EDC 交鏈交鏈當量比 (HA:EDC) | 1 : 4 | --- | ---- |
| EDC 交鏈溫度(°C)/時間(小時) | 25/4 | --- | ---- |
| 體外透明質酸酵素降解試驗, (220U/mL, 35°C, 過夜) | 10.74% | 100% | 73.57% |

由表2可知，依據本發明之方法之實施例5所製得之產物具有較比較例6與7優異之抗生物降解性。

實施例6

EDC-環氧化物分段雙重交鏈透明質酸水凝膠之製法

配製分子量22萬、pH 4.7固形份2.5%的透明質酸水溶液，再緩緩加入EDC(透明質酸與EDC之交鏈當量比為1:8)，攪拌均勻，於室溫下反應4小時後，透明質酸水凝膠形成。以50%酒精清洗浸泡5天，經過擠碎、冷凍乾燥，形成粉末狀，再將此透明質酸粉末(HA/EDC)浸泡於pH 10的水中，以EX-810(商品名，Nagase公司販售，為



五、發明說明 (22)

EGDGE，乙二醇二縮水甘油醚)(透明質酸與EX-810之交鏈當量比為1:20)於室溫下反應4小時進行第二次交鏈。反應後將所得之產物置入透析膜中，對水透析一晚，透析完後之水凝膠再經過冷凍乾燥後，進行酵素分解測試。

比較例8

以實施例6之相同配方，但不加入任何交鏈劑，不經任何交鏈反應，用實施例1相同之成膜方法形成薄膜，做體外透明質酸酵素降解試驗。

比較例9

進行EDC交鏈之透明質酸材料之製造，但僅進行一段交鏈反應，係使用EDC (HA:EDC當量比=1:8)做為交鏈劑，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表4所示。

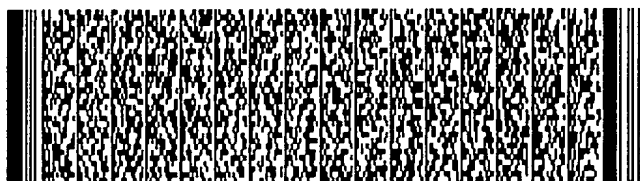


表 4

| | 實施例 6 | 比較例 8 | 比較例 9 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|
| 第一段 EDC 交鏈當量比 (HA:EDC) | 1:8 | --- | 1 : 8 |
| EDC 交鏈溫度(°C)/時間(小時) | 25/4 | --- | 25/4 |
| 第二段 EX-810 交鏈當量比 (HA:Ex-810) | 1 : 20 | --- | ----- |
| 環氧化物交鏈溫度(°C)/時間(hr) | 25/4 | --- | ---- |
| 體外透明質酸酵素降解試驗， (220U/mL,35°C，過夜) | 5.88% | 72.38% | 69.09% |

實施例 7

EDC-環氧化物分段雙重交鏈透明質酸水凝膠之製法

配製分子量22萬、pH 4.7固形份2.5%的透明質酸水溶液，緩緩加入EDC，攪拌均勻，於室溫下反應4小時後，透析一晚、冷凍乾燥，再將此透明質酸粉末(HA/EDC)溶於於pH 10的水中(固形份仍為2.5%)，以EX-810於室溫下反應4小時進行第二次交鏈，反應後即為水凝膠，以50%酒精清洗，清洗後之水凝膠再經過冷凍乾燥後，準備進行酵素分解測試。



五、發明說明 (24)

比較例10

以實施例7之相同配方，但不加入任何交鏈劑，不經任何交鏈反應，用實施例1相同之成膜方法形成薄膜，做體外透明質酸酵素降解試驗。

比較例11

如實施例7之相同方式進行透明質酸水凝膠之製造，但僅進行一段交鏈反應，係使用EDC (HA : EDC 當量比=1 : 16) 做為交鏈劑，所使用之交鏈劑濃度及反應溫度與時間如表5所示。

表 5

| | 實施例 7 | 比較例 10 | 比較例 11 |
|---|--------|--------|--------|
| 第一段 EDC 交鏈交鏈當量比 (HA : EDC) | 1:16 | --- | 1 : 16 |
| 環氧化物交鏈溫度 ($^{\circ}\text{C}$)/時間(hr) | 25/4 | --- | 25/4 |
| 第二段 EX-810 交鏈當量比 (HA : Ex-810) | 1 : 20 | --- | ----- |
| EDC 交鏈溫度($^{\circ}\text{C}$)/時 間(小時) | 25/4 | --- | ---- |
| 體外透明質酸酵素降解試 驗，(220U/mL, 35 $^{\circ}\text{C}$ ，過夜) | 0.1% | 72.38% | 31.93% |



五、發明說明 (25)

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。



圖式簡單說明

第1a圖為本發明之實施例3中透明質酸經過環氧化物交鏈反應後之膜之FTIR光譜圖。

第1b圖為本發明之實施例3中透明質酸經過環氧化物及碳二亞胺進行分段、雙重交鏈後所得產物之FTIR光譜圖。



六、申請專利範圍

1. 一種製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，包括下列步驟：

(a) 將透明質酸或其鹽形成溶液，

(b) 使該透明質酸或其鹽之溶液與擇自環氧類化合物交鏈劑或碳二亞胺類交鏈劑二者進行第一次交鏈反應，及

(c) 將步驟(b)所得之產物與擇自環氧類化合物交鏈劑與碳二亞胺類交鏈劑二者中且未在步驟(b)中使用之一者進行第二次交鏈反應，而獲得雙重交鏈透明質酸材料。

2. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中該環氧類化合物交鏈劑中之環氧類化合物為多官能基環氧類化合物。

3. 如申請專利範圍第2項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中該環氧類化合物交鏈劑中之環氧類化合物擇自1,4-丁二醇二縮水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether; BDDE)、乙二醇二縮水甘油醚(ethylene glycol diglycidyl ether; EGDGE)、1,6-己二醇二縮水甘油醚(1,6-hexanediol diglycidyl ether)、聚乙二醇二縮水甘油醚(Polyethylene glycol diglycidyl ether)、聚丙二醇二縮水甘油醚(Polypropylene glycol diglycidyl ether)、聚四亞甲基二醇二縮水甘油醚(polytetramethylene glycol diglycidyl ether)、新戊二醇二縮水甘油醚(Neopentyl glycol diglycidyl ether)、聚甘油多縮水甘油醚(polyglycerol polyglycidyl ether)、二甘油聚縮水甘油



六、申請專利範圍

醚(diglycerol polyglycidyl ether)、甘油聚縮水甘油醚(glycerol polyglycidyl ether)、三羥甲基丙烷聚縮水甘油醚(tri-methylolpropane polyglycidyl ether)、季戊四醇聚縮水甘油醚(Pentaerythritol Polyglycidyl Ether)、山梨糖醇聚縮水甘油醚(sorbitol polyglycidyl ether)、及其混合物所組成之組群。

4. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中該透明質酸或其鹽與該環氧類化合物交鏈劑以1：50至1：1之交鏈當量比進行交鏈反應。

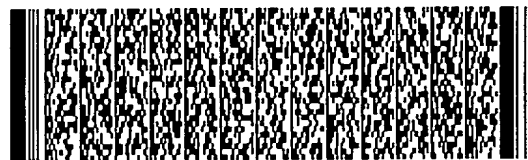
5. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中該環氧類化合物交鏈劑中之環氧化物濃度為1至30重量百分比。

6. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中以環氧化物交鏈劑進行之交鏈反應溫度在20至60℃之間。

7. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中以環氧化物交鏈劑進行之交鏈反應時間在30分鐘至12小時之間。

8. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中該碳二亞胺類交鏈劑中之碳二亞胺類係擇自1-甲基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺、3-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺、或其混合物所組成之組群。

9. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質



六、申請專利範圍

酸材料之方法，其中該透明質酸或其鹽與該碳二亞胺類交鏈劑以1：50至1：1之交鏈當量比進行交鏈反應。

10. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中該碳二亞胺濃度為該碳二亞胺類交鏈劑之0.5至30重量百分比。

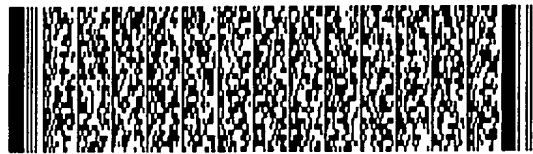
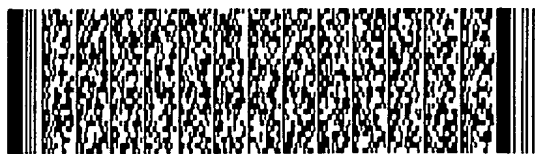
11. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中以碳二亞胺類交鏈劑進行之交鏈反應溫度在20至60℃之間。

12. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中以碳二亞胺類交鏈劑進行之交鏈反應時間在30分鐘至12小時之間。

13. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中在進行步驟(b)前，先將該透明質酸或其鹽之溶液製成薄膜、纖維、圓球、多孔性型態之基材、或膠體，再進行第一次交鏈反應。

14. 如申請專利範圍第13項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中將重量濃度在1至20重量百分比之透明質酸或其鹽之溶液置入模具內以25至70℃之溫度乾燥，製成厚度為10至500 μm 之薄膜狀材料，再進行第一次交鏈反應。

15. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中在進行步驟(b)之後及步驟(c)之前，先將步驟(b)所得之產物製成薄膜、纖維、圓球、多孔性等型態之基材、或膠體，清洗及乾燥後再進行第二次交鏈



六、申請專利範圍

反應。

16. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中在步驟(c)之後更包括一步驟(d)清洗及烘乾所製得雙重交鏈透明質酸材料。

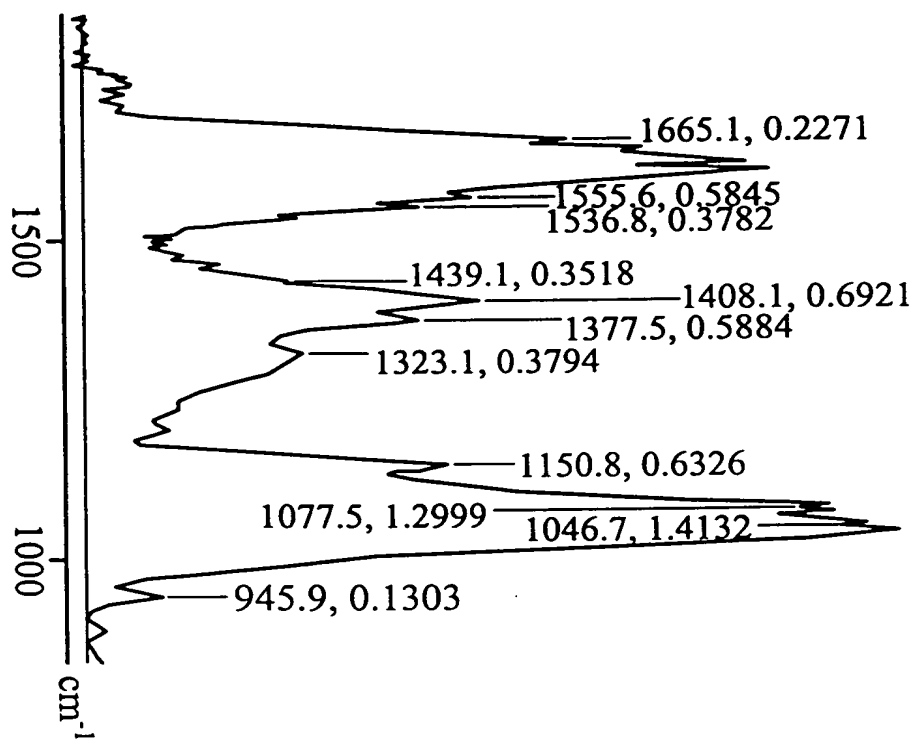
17. 如申請專利範圍第16項所述之雙重交鏈透明質酸材料，其中該步驟(d)包括清洗及在60℃以下溫度烘乾。

18. 如申請專利範圍第1項所述之製造雙重交鏈透明質酸材料之方法，其中雙重交鏈透明質酸材料為、薄膜、纖維、圓球、多孔性、或水凝膠型態。

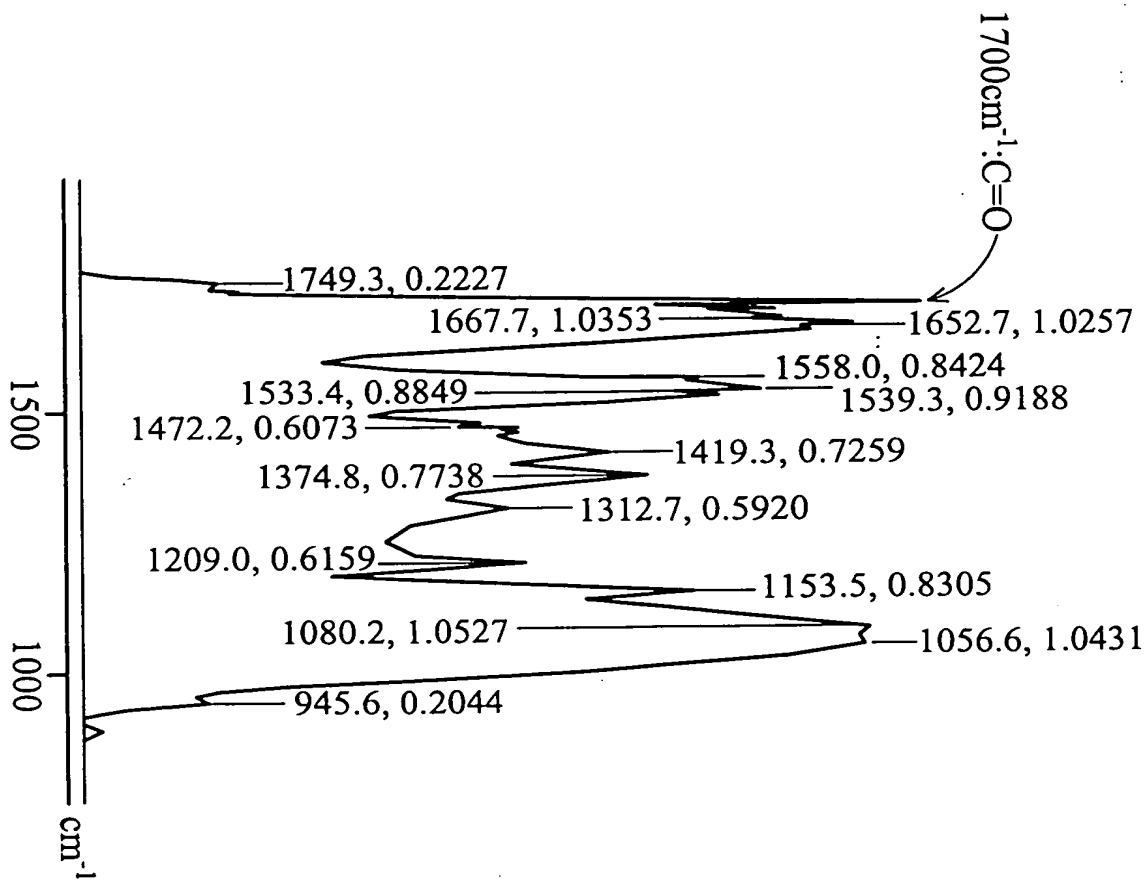
19. 一種雙重交鏈透明質酸材料，係由如申請專利範圍第1項所述之方法所製得。



第1a圖



第1b圖



100


100

THE UNIVERSITY OF CHICAGO




100

100



100

A large, dense, black and white abstract pattern, possibly a high-resolution scan of a textured surface or a complex digital artifact. The pattern consists of numerous small, irregular black shapes and lines scattered across a white background, creating a complex, noisy texture. The overall appearance is that of a high-contrast, grainy image, possibly a scan of a physical material or a digital noise pattern.



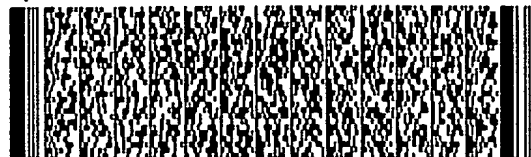
1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 2679, 26

第 12/34 頁



第 12/34 頁



第 13/34 頁



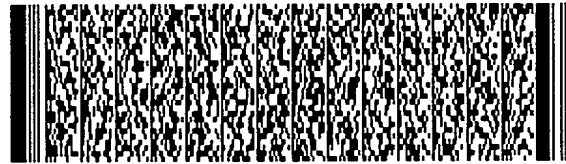
第 14/34 頁



第 14/34 頁



第 15/34 頁



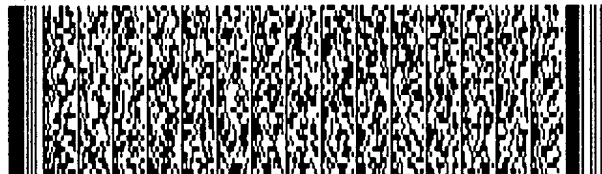
第 15/34 頁



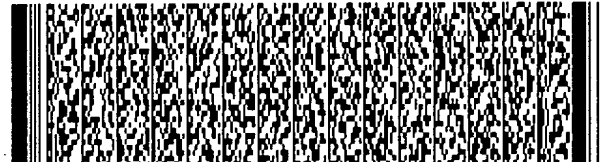
第 16/34 頁



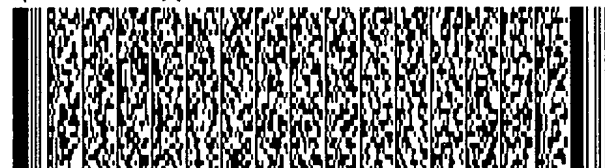
第 16/34 頁



第 17/34 頁



第 17/34 頁



第 18/34 頁



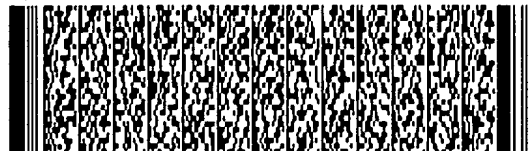
第 18/34 頁



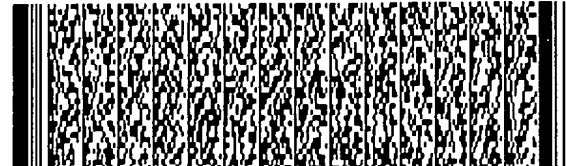
第 19/34 頁



第 19/34 頁



第 20/34 頁



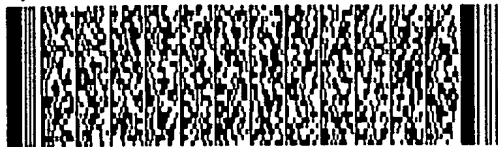
第 21/34 頁



第 21/34 頁



第 22/34 頁



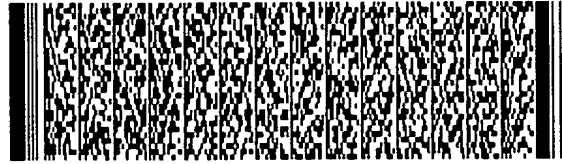
第 23/34 頁



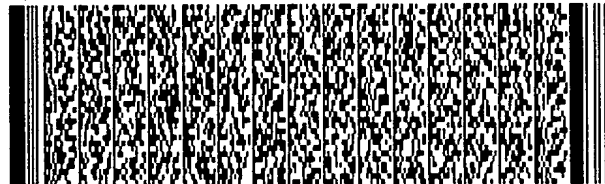
第 24/34 頁



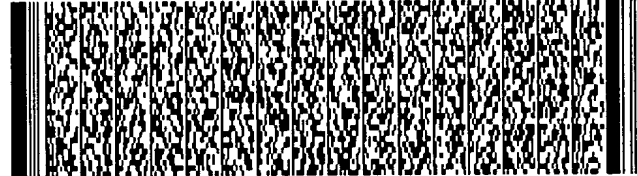
第 24/34 頁



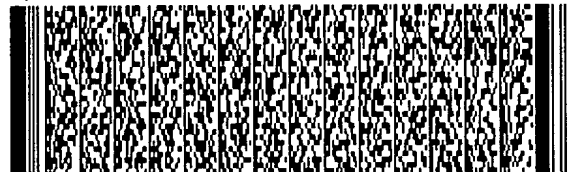
第 25/34 頁



第 26/34 頁



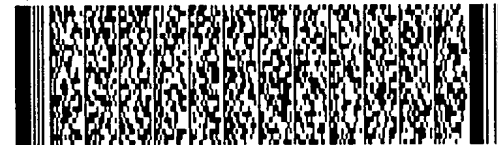
第 27/34 頁



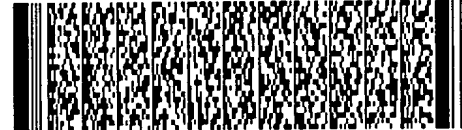
第 28/34 頁



第 29/34 頁



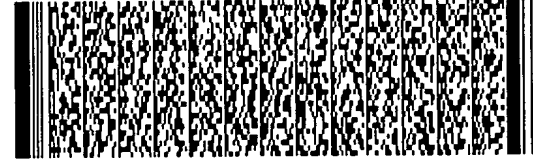
第 30/34 頁



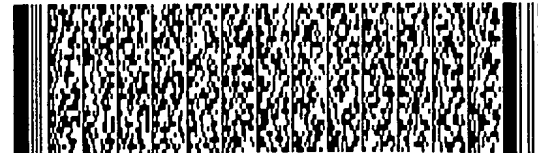
第 31/34 頁



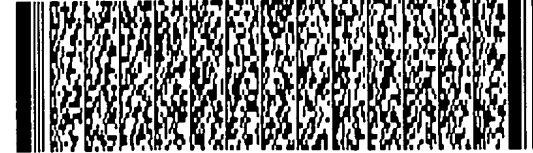
第 31/34 頁



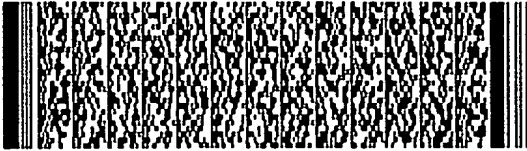
第 32/34 頁



第 32/34 頁



第 33/34 頁



第 33/34 頁



第 34/34 頁



Best Available Copy